

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局



(43) 国际公布日:

2005年9月29日(29.09.2005)

PCT

(10) 国际公布号:

WO 2005/089776 A1

(51) 国际分类号<sup>7</sup>: A61K 31/702, C08B 37/00, C07H 3/06, A61P 25/28, 3/10

(21) 国际申请号: PCT/CN2005/000226

(22) 国际申请日: 2005年2月25日(25.02.2005)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权: 200410023827.0 2004年3月24日(24.03.2004) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中国海洋大学(OCEAN UNIVERSITY OF CHINA) [CN/CN]; 中国山东省青岛市鱼山路五号, Shandong 266003 (CN)。

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 耿美玉(GENG, Meiyu) [CN/CN]; 辛现良(XIN, Xianliang) [CN/CN]; 孙广强(SUN, Guangqiang) [CN/CN]; 中国山东省青岛市鱼山路五号, Shandong 266003 (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号陈剑华, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:  
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: ALGIN OLIGOSACCHARIDES AND THE DERIVATIVES THEREOF AS WELL AS THE MANUFACTURE AND THE USE OF THE SAME

(54) 发明名称: 褐藻胶寡糖及其衍生物及其制备方法和用途

(57) Abstract: The present invention provides algin oligosaccharides having polymerized degree of 2-22 and the derivatives thereof, such algin oligosaccharides are made of mannuronic acid bonded by  $\alpha$ -1,4 glycosidic bond. The derivatives which the reduced terminal in position-1 is carboxyl radical can be obtained by oxidation. The invention also provides the manufacture of algin oligosaccharides and the derivatives thereof, which includes the alginate solution in water reacts in the reactor under the condition of high press, 100-120°C, pH2-6, for 2-6 hours, after the reaction completed, its pH value was adjusted to 7. The result oligosaccharides are oxidated in presence of the oxidant, and then produce the oxidated products. The algin oligosaccharides and the derivatives thereof of the invention can be used in the manufacture of medicaments for preventing Alzheimer's dementia.

(57) 摘要

本发明提供聚合度为 2—22 的褐藻胶寡糖及其衍生物, 所述褐藻胶寡糖由 $\beta$ -D-甘露糖醛酸通过 $\alpha$ -1,4 糖苷键连接而成。将其氧解, 可以得到还原端 1 位为羧基的衍生物。本发明还提供所述褐藻胶寡糖及其衍生物的制造方法, 它包括将褐藻酸盐水溶液在高压釜中于 pH2—6、温度 100—120°C 的条件下反应 2—6 小时, 反应中止后, 调节 pH 值至 7。将所得寡糖在氧化剂存在下氧解, 制得氧解产物。本发明的褐藻胶寡糖及其衍生物可用于制备老年性痴呆症和糖尿病防治药物。



WO 2005/089776 A1

## 褐藻胶寡糖及其衍生物及其制备方法和用途

### 技术领域

本发明涉及一种褐藻胶寡糖及其衍生物和它们的制造方法和在治疗老年性痴呆、治疗  
5 糖尿病方面的应用。

### 背景技术

老年性痴呆和糖尿病是目前严重危害人类健康的多发病和常见病，尤其是随着世界老年  
人口的日益增多，其发病率有逐年升高的趋势，因此老年性痴呆和糖尿病的防治显得越来  
10 越重要。

目前用于老年性痴呆的防治药物包括中枢兴奋剂、改善胆碱能的物质、脑血液循环改善  
剂、中草药及吡咯烷酮类化合物等，多存在疗效不确切、特异性不强，或毒副作用大、口  
服吸收差、不易透过血脑屏障，特别是治标不治本的缺点，限制了他们的广泛应用。临床  
常用的糖尿病防治药物主要包括胰岛素和口服降糖药物，多存在使用不便及毒副作用大等  
15 缺点，尤其是缺乏合适的用于 II 型糖尿病的有效药物。研究发现，老年性痴呆及 II 型糖尿  
病的发病过程与淀粉样蛋白 ( $\beta$ -amyloid, 简称 A $\beta$ , 及 amylin) 沉积，继而形成纤维缠结  
及其引发的自由基氧化损伤有关。因此通过拮抗淀粉样蛋白纤维的形成及其毒性是防治老  
年性痴呆及 II 型糖尿病的有效途径。

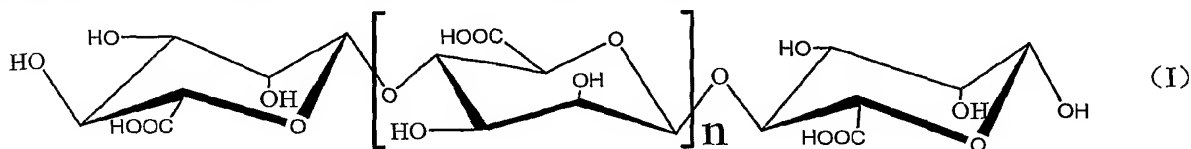
褐藻胶是褐藻细胞壁的主要组成成分，是由 $\beta$ -D-甘露糖醛酸和 $\alpha$ -L-古罗糖醛酸通过 1,4  
20 糖苷键连接形成的线形阴离子多糖。褐藻胶是一种高分子化合物，分子量较大，一般在几  
万至几百万道尔顿之间。褐藻胶来源丰富，并已广泛应用于食品、化工和医药业等。近年  
来的研究发现褐藻胶具有多种生物活性，但由于其分子量较大，使其在药物应用方面受到  
一定的限制。因此通过各种降解方法制备的褐藻胶寡糖，在糖化学、糖生物学、糖工程以  
及糖类药物研究等领域具有重要的研究价值。多糖可以用很多方法进行降解，包括酶解法、  
25 化学降解法和物理降解法。酶解法由于需要特异性降解褐藻胶的酶，使其应用受到限制。  
物理降解法一般与其他降解方法一起使用，降解产物的极限分子量为 50,000Da 左右，不易  
制得寡糖。用于糖类降解的化学降解法主要有酸水解法和氧化降解法，但常规的酸解法由  
于是在常温常压下进行，因此不易获得分子量在 4000 以下的寡糖，使其应用受到限制。

### 发明内容

鉴于上述情况，本发明者进行了深入的研究，结果发现，在高温高压下进行酸水解，  
可以得到分子量在 4000 以下的褐藻胶寡糖，并在氧化剂存在下制备了其还原端 1 位为羧基  
的衍生物，在此基础上完成了本发明。

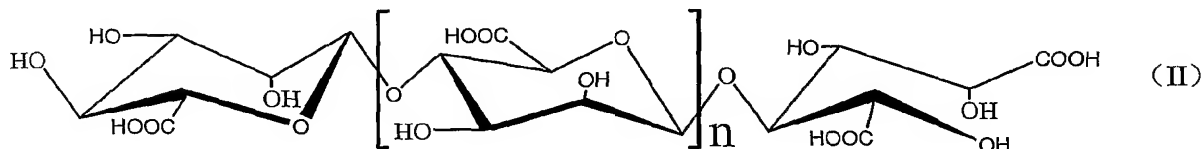
即，本发明提供一种低分子量的褐藻胶寡糖及其衍生物或它们的药用盐以及这些化合  
35 物的制造方法。本发明还提供包含上述低分子量褐藻胶寡糖或其衍生物或它们的药用盐的  
老年性痴呆症及糖尿病防治药物。

本发明涉及下列结构式 (I) 表示的褐藻胶寡糖及其衍生物或它们的药用盐, 所述褐藻胶寡糖由 $\beta$ -D-甘露糖醛酸通过 $\alpha$ -1,4 糖苷键连接而成,



式中,  $n$  表示 0 或 1—19 的整数。

在本发明中, 所述褐藻胶寡糖衍生物的一个例子是由下列结构式 (II) 表示的化合物, 其还原端 1 位为羧基。



式中,  $n$  表示 0 或 1—19 的整数。

上述式 (I) 和 (II) 中, 以  $n=2-10$  为佳,  $n=4-8$  尤佳。四糖至十二糖 (更好的是六糖至十糖) 的生物效果较佳的原因尚不清楚, 但可能是它们较易被机体细胞识别和接受。

所述褐藻胶寡糖衍生物例如还包括甘露糖醛酸中的一部分羟基被硫酸酯化了的衍生物。

所述褐藻胶寡糖或其衍生物的药用盐例如可以是这些化合物的钠盐、钾盐、钙盐、镁盐等, 其中优选钠盐。所述药用盐可用常规方法制得。

本发明还涉及上述褐藻胶寡糖及其衍生物的制造方法, 其特征是, 将褐藻酸盐水溶液在高压釜中于 pH2-6、反应温度约 100-120°C 的条件下反应约 2-6 小时; 反应结束后, 调节 pH 值至 7 左右。其氧解产物是在褐藻胶寡糖溶液中加入氧化剂反应获得。

在本发明的一个较佳实施方式中, 将 0.5-5% 褐藻酸钠水溶液在高压釜中于 pH4、反应温度 110°C 的条件下加热反应 4 小时。反应结束后, 将反应液吸出, 自然冷却, 用 NaOH 溶液调节 pH 值为 7。边搅拌, 边将滤液缓缓倒入 4 倍于滤液体积的工业酒精中, 静止醇沉过夜。将醇沉物质抽滤至干燥, 并用无水乙醇洗涤脱水, 得到的白色滤饼于 60°C 烘箱中干燥, 得褐藻胶寡糖粗品。将褐藻胶寡糖粗品配成 10% 的溶液, 用 95% 的乙醇溶液进行沉淀, 将沉淀用无水乙醇洗涤, 干燥后, 配成 5% 溶液, 用 3 $\mu$ m 膜过滤除杂质, 在 Bio-Gel-P6 凝胶柱 (1.6 $\times$ 180cm) 上进行脱盐, 流动相为 0.2mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 分步收集, 洗脱液用硫酸-咔唑法检测, 合并含糖组分, 减压浓缩并除盐, 冷冻干燥, 即得。

结构式 (II) 所示的衍生物的制备方法是, 在上述将褐藻酸盐水溶液在高压釜中于 pH2-6、反应温度约 100-120°C 的条件下反应时间约 2-6 小时的步骤之后, 再加入氧化剂, 在反应温度 100-120°C 的条件下反应 15 分钟至 2 小时。在一个具体实施方式中, 向 10% 氢氧化钠溶液 50ml 中加入 5% 的硫酸铜溶液 25ml, 立即混匀, 并立即加入 5% 的褐藻胶寡糖溶液 40ml, 沸水浴中加热, 至不再有砖红色沉淀产生。取出离心, 去除沉淀, 取上清液少许, 按上述比例加入到 10% 氢氧化钠溶液和 5% 的硫酸铜溶液中, 检查是否还有砖红色沉淀产生。若无, 上清液加入 4 倍体积的 95% 乙醇醇沉, 过夜, 将沉淀抽滤压干, 并用无水乙醇

反复脱水。烘箱中 60℃ 烘干。按上述结构式 (1) 的褐藻胶寡糖的制备中相同分离方法分离。

本发明还提供一种药学组合物，它包含有效量的上述褐藻胶寡糖或其衍生物或它们的药用盐和药用载体。

所述药学组合物可以是老年性痴呆防治药物。

5 此外，所述药学组合物可以是  $\beta$ -淀粉样蛋白纤丝形成抑制剂及纤丝解聚促进剂。

所述药学组合物还可以是糖尿病防治药物。

此外，所述药学组合物可用作胰岛淀粉样蛋白纤丝形成抑制剂、胰岛淀粉样蛋白多肽抑制剂。将本发明的褐藻胶寡糖用于制备老年性痴呆症和糖尿病的防治药物，对于解决当前老年性痴呆和糖尿病缺乏有效防治药物的困难，具有特别重要的意义。

10

### 附图说明

图 1 是酸法降解后用 Bio-gel P6 柱分离的本发明的褐藻胶寡糖的流出曲线

图 2 是本发明的褐藻胶寡糖的 MALDI-TOF 图

图 3 褐藻胶寡糖氧解产物用 Bio-gel P6 柱分离的流出曲线

15 图 4 褐藻胶寡糖氧解产物的 MALDI-TOF 图 (Positive mode)

图 5 示出本发明的褐藻胶寡糖对  $A\beta_{1-40}$  所致学习记忆障碍小鼠避暗潜伏期的影响

图 6 示出本发明的褐藻胶寡糖对  $A\beta_{1-40}$  所致学习记忆障碍小鼠避暗错误次数的影响

图 7 示出本发明的褐藻胶寡糖对  $A\beta_{25-35}$  损伤神经母细胞瘤 SH-SY5Y 的保护作用

图 8 示出本发明的褐藻胶寡糖对  $A\beta_{1-40}$  损伤神经母细胞瘤 SH-SY5Y 的保护作用

20 图 9 示出本发明的褐藻胶寡糖对正常及肝素促  $A\beta_{1-40}$  纤丝形成的抑制作用

图 10 示出本发明的褐藻胶寡糖对  $A\beta_{1-40}$  纤丝解聚的影响

图 11 示出本发明的褐藻胶寡糖对溶液中 250  $\mu\text{g/ml}$   $A\beta_{1-40}$  构象变化的影响

图 12 示出本发明的褐藻胶寡糖对 IAAP 引起 NIT 细胞损伤的保护作用

25 图 13 示出本发明的褐藻胶寡糖氧解产物混合物对  $A\beta_{1-40}$  脑内注射所致痴呆小鼠 Morris 水迷宫寻找平台潜伏期的影响

图 14 示出本发明的褐藻胶寡糖氧解产物混合物对  $A\beta_{1-40}$  脑内注射所致痴呆小鼠 Morris 水迷宫游泳距离的影响

图 15 示出本发明的褐藻胶寡糖氧解产物混合物对  $A\beta_{1-40}$  脑内注射所致痴呆小鼠 Morris 水迷宫第一次到达平台时间的影响

30 图 16 示出本发明的褐藻胶寡糖氧解产物混合物对  $A\beta_{1-40}$  脑内注射所致痴呆小鼠 Morris 水迷宫穿越平台次数的影响

图 17 示出本发明的褐藻胶寡糖氧解产物混合物对 IAAP 引起 NIT 细胞损伤的保护作用

### 具体实施方式

35 (一) 褐藻胶寡糖的制备:

称取 1g 多聚甘露糖醛酸钠盐 (重均分子量 8,235Da, 中国海洋大学兰太药业有限公司提供), 加入蒸馏水配成 1% 溶液, 用盐酸调节 pH 值为 4, 置于高压釜中, 在 110℃ 加热 4

小时。取出冷却后，用 NaOH 溶液调节 pH 值为 7，边搅拌，边将滤液缓缓倒入 4 倍于滤液体积的工业酒精中，静止、醇沉过夜。将醇沉物质抽滤至干燥，并用无水乙醇洗涤脱水，得到的白色滤饼于 60℃ 烘箱中干燥，得褐藻胶寡糖粗品。

取褐藻胶寡糖粗品，配成 10% 的溶液，用 95% 的乙醇溶液进行沉淀，将沉淀用无水乙醇洗涤，干燥后，配成 5% 溶液，用 3 $\mu$ m 膜过滤除杂质，在 Bio-Gel-P6 凝胶柱 (1.6 $\times$ 180cm) 上进行脱盐分离，流动相为 0.2mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>，分步收集，洗脱液用硫酸-咔唑法检测，收集各含糖组分，减压浓缩，上 G-10 柱进行脱盐，外水体积组分继续上 Bio-Gel-P10 凝胶柱 (1.6 $\times$ 180cm) 分离，冷冻干燥，得系列褐藻胶寡糖 (图 1)。

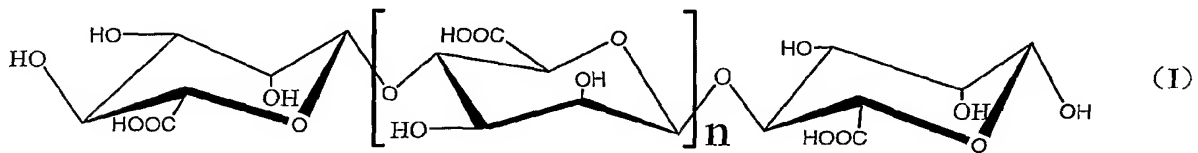
## (二) 褐藻胶寡糖氧解产物的制备

取 5g 上述制备的褐藻胶寡糖配成 5% 的溶液。向 10% 氢氧化钠溶液 50ml 中加入 5% 的硫酸铜溶液 25ml，立即混匀，并立即加入 5% 的褐藻胶寡糖溶液 40ml，沸水浴中加热，至不再有砖红色沉淀产生。取出离心，去除沉淀，取上清液少许，按上述比例加入到 10% 氢氧化钠溶液和 5% 的硫酸铜溶液中，检查是否还有砖红色沉淀产生。若无，上清液加入 4 倍体积的 95% 乙醇醇沉，过夜，将沉淀抽滤压干，并用无水乙醇反复脱水。烘箱中 60℃ 烘干。得褐藻胶寡糖氧解产物粗品。

取褐藻胶寡糖氧解产物粗品，配成 10% 的溶液，用 95% 的乙醇溶液进行沉淀，将沉淀用无水乙醇洗涤，干燥后，配成 5% 溶液，用 3 $\mu$ m 膜过滤除杂质，在 Bio-Gel-P6 凝胶柱 (1.6 $\times$ 180cm) 上进行脱盐分离，流动相为 0.2mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>，分步收集，洗脱液用硫酸-咔唑法检测，收集各含糖组分，减压浓缩，上 G-10 柱进行脱盐，外水体积组分继续上 Bio-Gel-P10 凝胶柱 (1.6 $\times$ 180cm) 分离，冷冻干燥，得系列褐藻胶寡糖氧解产物 (图 2)。

## (三) 褐藻胶寡糖的结构鉴定

对上述褐藻胶寡糖的制备中得到的流分所含寡糖进行结构鉴定，确定该系列寡糖是由  $\beta$ -D-甘露糖醛酸经  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接而成的褐藻胶寡糖。其结构式为：



式中，n 表示 0 或 1—19 的整数。

下面以含流出液第 292mL 处前后的流分 (图 1 中以“6”标出的流分，以下称组分 6) 为例，说明对上述寡糖的结构解析。

### 1. 紫外吸收图谱

将上述流出液 292mL 处前后的流分中所含寡糖稀释至合适浓度，用 UV-2102 紫外可见分光光度计在 190nm-400nm 间扫描，发现该流分在紫外区无特异性吸收峰，说明结构中无共轭双键结构。但是在 190-200nm 处有非特异性吸收，因此该系列寡糖在脱盐时可采用该区段紫外光进行在线检测。

## 2. 红外光谱测定

取 0.5mg 上述流分的寡糖，用 KBr 压片，通过 NEXUS-470 智能型红外光谱仪进行红外光谱测定。结果发现，在 3420.79、3214.64、2924.61  $\text{cm}^{-1}$  处有羟基的对称伸缩振动，1600.25  $\text{cm}^{-1}$  为羧酸盐的羰基对称伸缩振动，1406.54  $\text{cm}^{-1}$  为羟基的剪式振动，1146.42  $\text{cm}^{-1}$  为羧基碳氧键的对称伸缩振动，1045.77  $\text{cm}^{-1}$  为环内醚的反对称伸缩振动，804.02  $\text{cm}^{-1}$  为甘露糖醛酸环骨架的反对称伸缩振动。表明该化合物含有羧基、羟基和甘露糖醛酸环的骨架结构。

## 3. 质谱分析

质谱分析中所用仪器为 Bruker Daltonics 公司 BIFLEX II 型 MALDI-TOF 质谱仪，由质谱图（图 2，其数据列于表 1 中）。可知， $m/z$  为 1073.9 的峰为分子离子峰  $[\text{M}-\text{H}]^{-1}$ ， $m/z$  为 1096.6 的峰为  $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^{-1}$ ， $m/z$  为 1028.0 的峰为  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{H}]^{-1}$ ， $m/z$  为 821.2 的峰为  $[\text{M}-\text{ManA}-\text{CH}_2\text{O}-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^{-1}$ ， $m/z$  为 704.3 的峰为  $[\text{M}-2\text{ManA}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^{-1}$ ， $m/z$  为 634.4 的峰为  $[\text{M}-2\text{ManA}-2(\text{CH}_2\text{O})-\text{CO}-\text{H}]^{-1}$ ， $m/z$  为 536.5 的峰为  $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ ， $m/z$  为 357.4 的峰为  $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$ 。上述流分所含寡糖的 ESI-MS 图中分子离子峰为  $m/z$  为 1073.9，说明其分子量为 1074。

表 1. 褐藻胶寡糖（组分 6）的质谱解析

碎片离子	$m/z$
$[\text{M}-\text{H}]^{-1}$	1073.9
$[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^{-1}$	1096.6
$[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{H}]^{-1}$	1028.0
$[\text{M}-\text{ManA}-\text{CH}_2\text{O}-2\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^{-1}$	821.1
$[\text{M}-2\text{ManA}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^{-1}$	704.3
$[\text{M}-2\text{ManA}-2(\text{CH}_2\text{O})-\text{CO}-\text{H}]^{-1}$	634.4
$[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$	536.5
$[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$	357.4

## 4. 褐藻胶寡糖核磁共振波谱测定

取式 (I) 表示的褐藻胶寡糖 ( $n=4$ )，使用 JNM-ECP600 核磁共振波谱仪测定其  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR，结果见表 2 和表 3。

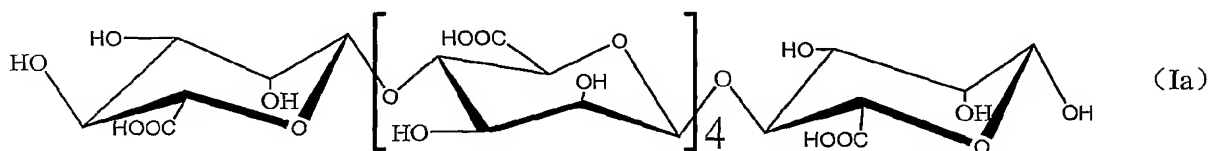
表 2. 褐藻胶寡糖（组分 6）的  $^1\text{H}$ -NMR 解析

	化学位移 (ppm)				
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5
r $\alpha$	5.21	3.98	4.03	4.04	4.16
r $\beta$	4.91	3.99	3.77	3.90	3.77
m $\alpha$	4.69	4.03	3.75	3.93	3.69
m $\beta$	4.64	4.03	3.75	3.65	3.69
n	4.63	3.74	3.63	3.75	4.01

表 3. 褐藻胶寡糖 (组分 6) 的  $^{13}\text{C}$ -NMR 解析

	化学位移 (ppm)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
r $\alpha$	93.54	70.06	69.02	78.37	72.60	175.84
r $\beta$	93.74	70.42	71.60	78.28	76.08	175.84
m	99.08	70.63	71.43	78.07	75.90	175.41
n	100.15	68.48	72.47	76.27	70.05	175.27

综合以上检测结果, 确定上述流分所含褐藻胶寡糖为甘露糖醛酸 6 糖, 具有下列化学结构式 (Ia):



#### 5. 褐藻胶寡糖样品中甘露糖醛酸含量的测定 ( $^1\text{H}$ -NMR 光谱法)

采用高分辨率  $^1\text{H}$ -NMR 研究褐藻胶寡糖的组成, 根据异头碳质子的信号强度来定量分析褐藻胶寡糖样品中的甘露糖醛酸与古洛糖醛酸之比 (M/G)。取干燥样品 3-5mg, 在中性 pH 下溶于  $\text{D}_2\text{O}$  中, 加入 0.3mg EDTA, 在 Bruker DPX-300 型核磁共振谱仪上测定, 谱图在  $70^\circ\text{C}$  下记录, 以使  $\text{D}_2\text{O}$  峰远离异头质子共振区, 信号相对强度用峰面积积分值来表示。结果显示, M 残基的 H-1 信号为 4.64 和 4.66 ppm (分别为 MM、MG, 序列中的 M 残基 H-1 信号)。G 残基的 H-1 信号均在 5.05 ppm 处 (二重峰), 样品中的 M 和 G 的相对含量可以用两者的 H-1 峰强度来表示, 公式如下:

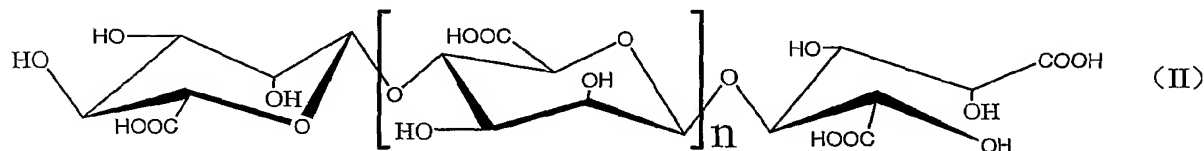
$$M\% = \frac{I_{4.64} + I_{4.66}}{I_{4.64} + I_{4.66} + I_{5.05}} \times 100\%$$

其中 I 代表峰强度, 用峰面积积分值来表示。

用此方法测得褐藻胶寡糖样品中的 D-甘露糖醛酸相对含量为 98.07%, 说明褐藻胶寡糖样品主要由甘露糖醛酸组成。

#### (四) 褐藻胶寡糖氧解产物的结构鉴定

对上述褐藻胶寡糖氧解产物的制备中得到的流分所含寡糖氧解产物进行结构鉴定, 确定该系列寡糖氧解产物是由  $\beta$ -D-甘露糖醛酸经  $\alpha$ -1,4 糖苷键连接而成的褐藻胶寡糖的衍生物, 其还原端 1 位为羧基。其结构式为:



式中, n 表示 0 或 1-19 的整数。

下面以组分 6 为例, 说明对上述寡糖氧解产物的结构解析。

### 1. 紫外光谱分析

取褐藻胶寡糖氧解产物适量，用蒸馏水配制成一定浓度，以蒸馏水作为空白，在岛津 UV-260 型紫外分光光度计(190nm~700nm)紫外可见分光光度计上进行全波长扫描。经测定，褐藻胶寡糖氧解产物在紫外和可见光区无特征吸收峰。

### 2. 红外光谱分析

采用 NICOLE NEXUS-470 智能型红外光谱仪，测定了褐藻胶寡糖氧解产物的红外光谱，解析结果见表 4。

表 4. 褐藻胶寡糖氧解产物 IR 谱图的解析结果

吸收峰( $\text{cm}^{-1}$ )	振动类型	基团	强度
3400.56	$\nu_{\text{OH}}$	-OH	s
3219.02	$\nu_{\text{OH}}$	-OH	s
	$\nu_{\text{CH}}$	-COOH	
2924.65	$\nu_{\text{OH}}$	-COOH	m
1599.76	$\nu_{\text{C=O}}$	-COOH	s
1405.95	$\nu_{\text{C-O}}$	-COOH	s
1296.26	$\delta_{\text{O-H}}$	-OH	m
1037.84	$\nu_{\text{as}}(\text{C-O-C})$	环内醚	m
817.14	$\nu_{\text{as}}(\text{糖环})$	甘露糖醛酸环骨架	m
669.80	$\gamma_{\text{OH}}$	-OH	m

### 3. 核磁共振氢谱 $^1\text{H-NMR}$ 分析

采用 Bruker Avance DPX—300 型核磁共振波谱仪测定了褐藻胶寡糖氧解产物核磁共振氢谱及碳谱，核磁共振氢谱 ( $^1\text{H-NMR}$ ) 发现，谱图主要由 $\beta$ -D-甘露糖醛酸的六个氢原子的信号组成，对各信号的裂分进行归属后可知，褐藻胶寡糖氧解产物分子主要由甘露糖醛酸组成。若还原端 1 位若为醛基，则 H-1 $\alpha$ 和 $\beta$ 的化学位移分别为 5.11 和 4.81ppm。因为褐藻胶寡糖还原端 1 位由醛基氧化成羧基，H-1 消失，其在 5.11 和 4.81ppm 的信号消失。核磁共振碳谱  $^{13}\text{C-NMR}$  分析结果表明，样品谱图主要由 $\beta$ -D-甘露糖醛酸的六个碳原子的信号组成，对各信号的裂分进行归属后可知，中间体分子主要由甘露糖醛酸组成。经与中间体谱图对照，甘露糖醛酸固有的还原端 C-1 信号(94ppm)消失了。还原端 C-1 信号移动到了低场了 175.81ppm。这是因为褐藻胶寡糖还原端 1 位由醛基氧化成羧基，其 C-1 的化学位移由醛基的 94ppm 左右变为羧基碳的 175.81ppm。

### 4. 质谱分析

质谱测定所用仪器为 Bruker Daltonics 公司 BIFLEX III 型 MALDI-TOF 质谱仪，结果如图 4 所示。由图可以得出，m/z 为 1113.7 的峰为  $[\text{M}+\text{Na}]^{+1}$ ，m/z 为 1113.7 的峰为  $[\text{M}-\text{O}+\text{Na}]^{+1}$ ，m/z 为 1083.7 的峰为  $[\text{M}-\text{CH}_2\text{O}+\text{Na}]^{+1}$ ，m/z 为 1067.6 的峰为  $[\text{M}-\text{CH}_2\text{O}-\text{O}+\text{Na}]^{+1}$ 。m/z 为 1053.6



的峰为 $[M-2(\text{CH}_2\text{O})+\text{Na}]^{+1}$ ,  $m/z$  为 979.6 的峰为 $[M-3(\text{CH}_2\text{O})-\text{CO}_2+\text{Na}]^{+1}$ 。  $m/z$  为 921.6 的峰为 $[M-4(\text{CH}_2\text{O})-\text{CO}_2-\text{CO}+\text{Na}]^{+1}$ 。褐藻胶寡糖氧解产物质谱解析见表 5。

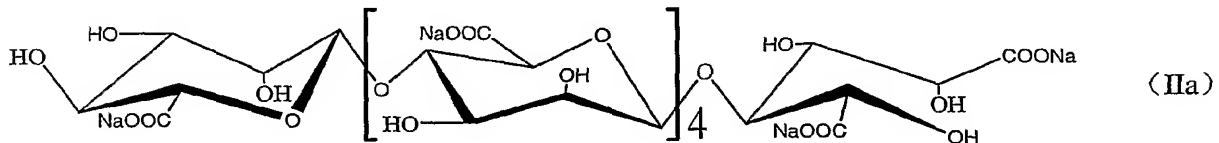
表 5. 褐藻胶寡糖氧解产物质谱解析

碎片离子	$m/z$
$[\text{M}+\text{Na}]^{+1}$	1113.7
$[\text{M}-\text{O}+\text{Na}]^{+1}$	1097.7
$[\text{M}-\text{CH}_2\text{O}+\text{Na}]^{+1}$	1083.7
$[\text{M}-\text{O}-\text{CH}_2\text{O}+\text{Na}]^{+1}$	1067.6
$[\text{M}-2(\text{CH}_2\text{O})+\text{Na}]^{+1}$	1053.6
$[\text{M}-3(\text{CH}_2\text{O})-\text{CO}_2+\text{Na}]^{+1}$	979.6
$[\text{M}-4(\text{CH}_2\text{O})-\text{CO}_2-\text{CO}+\text{Na}]^{+1}$	921.6

5

褐藻胶寡糖氧解产物的 MALDI-TOF 图中  $m/z$  为 1113.7 的峰为 $[\text{M}+\text{Na}]^{+1}$ , 说明褐藻胶寡糖氧解产物的分子量为 1090.7。与酸降解褐藻胶寡糖(分子量 1075)相比多 16, 即分子中多了一个氧, 可以认为褐藻胶寡糖在制备过程中被氧化。

综合以上检测结果, 该褐藻胶寡糖氧解产物的化学结构式为 (IIa):



10

#### (五) 褐藻胶寡糖对老年性痴呆症 (AD) 的疗效评价

在下述实验中, 所用的褐藻胶寡糖是用 Bio-Gel-P6 凝胶柱分离后的 6 糖。

##### 1. 褐藻胶寡糖体内对 $\text{A}\beta_{1-40}$ 致动物痴呆模型的影响

15 取 18-22g 雄性 Balb/c 小鼠 (由山东大学实验动物中心提供) 称重并随机分为 6 组, 即对照组、模型组、褐藻胶寡糖低、中、高 (15、30、60mg/kg) 三个剂量组、阳性对照药哈伯因 (HBY, 河南竹林众生制药公司豫中制药厂生产) 0.2mg/kg 组。动物于分组后第三天开始给予相应药物, 给药量 0.5 ml/20g, 对照组、模型组灌服等量生理盐水, 每日 1 次, 连续至实验结束。

20 于给药后第 8 天, 除对照组外, 参照 Jhoo JH 等,  $\beta$ -amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. *Behavioural Brain Research* (2004) 155: 185-196 中记载的方法, 向所有小鼠单侧脑室内注射  $\text{A}\beta_{1-40}$ , 制造小鼠学习记忆功能障碍模型, 并采用 Morris 水迷宫及避暗实验和脑组织生化指标的测定评价药物对小鼠学习记忆功能的影响。结果发现 (表 6), 模型组与对照组相比, 寻找平台潜伏期显示出明显或极明显差异 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 说明  $\text{A}\beta_{1-40}$  单侧脑室注射致  
25 小鼠痴呆模型已经建立。各处理组中, 第 1 天除褐藻胶寡糖 15 mg/kg 组外其余各组较模型组有缩短趋势, 其中褐藻胶寡糖 60mg/kg 组与模型组相比潜伏期显著缩短 ( $P<0.05$ )。第 2、

3 天, 各给药组潜伏期均比模型组缩短, 其中褐藻胶寡糖 60mg/kg 和 HBY 达统计学意义 ( $P<0.05$ )。

表 6. 褐藻胶寡糖对  $A\beta_{1-40}$  致痴呆模型小鼠 Morris 水迷宫寻找平台潜伏期的影响 ( $\bar{x} \pm SE$ )

组别	剂量 (mg/kg)	n	寻找平台潜伏期 (秒)		
			第一天	第二天	第三天
对照	—	12	49.40 $\pm$ 8.39	54.30 $\pm$ 11.39	42.80 $\pm$ 10.04
模型	—	14	87.20 $\pm$ 7.58 <sup>##</sup>	93.46 $\pm$ 8.67 <sup>#</sup>	97.31 $\pm$ 8.65 <sup>##</sup>
褐藻胶寡糖	15	14	90.07 $\pm$ 10.71	83.29 $\pm$ 9.53	72.83 $\pm$ 12.50
	30	14	77.71 $\pm$ 8.69	71.69 $\pm$ 10.11	68.45 $\pm$ 14.46
	60	13	56.92 $\pm$ 9.92 <sup>*</sup>	63.57 $\pm$ 10.54 <sup>*</sup>	62.50 $\pm$ 13.10 <sup>*</sup>
HBY	0.2	14	76.29 $\pm$ 9.74	64.58 $\pm$ 10.36 <sup>*</sup>	63.83 $\pm$ 10.12 <sup>*</sup>

<sup>#</sup> $P<0.05$ , <sup>##</sup> $P<0.01$ , 与对照组比; <sup>\*</sup> $P<0.05$ , 与模型组比

水迷宫测试第 4 天, 撤去实台, 动物在规定 60 秒内留经原实台所在象限时间百分数的测定结果显示, 模型组显著地低于对照组( $P<0.05$ ), 而褐藻胶寡糖 60mg/kg 组动物停留时间明显高于模型组 ( $P<0.05$ )。结果见表 7。

表 7. 褐藻胶寡糖对  $A\beta_{1-40}$  致痴呆模型小鼠 Morris 水迷宫测试学习记忆能力的影响 ( $\bar{x} \pm SE$ )

组别	剂量 (mg/kg)	n	象限百分数 (%)
对照	—	12	29.48 $\pm$ 5.47
模型	—	14	11.83 $\pm$ 3.33 <sup>#</sup>
褐藻胶寡糖	15	14	19.67 $\pm$ 5.15
	30	14	22.99 $\pm$ 5.79
	60	13	28.44 $\pm$ 6.08 <sup>*</sup>
HBY	0.2	14	22.18 $\pm$ 5.93

<sup>#</sup> $P<0.05$ , 与对照组比; <sup>\*</sup> $P<0.05$ , 与模型组比;

自  $A\beta$  造模后 25 天开始进行避暗实验。训练时, 将通向暗室的门打开, 暗室内底部栅板通电 (36v)。分别取各组动物, 头部向外放入避暗实验盒中, 动物四足进入暗室后将受到电击。24 小时后同法测试, 记录小鼠进入暗室遭受刺激所需时间 (潜伏期) 和设定时间内 (3min) 遭受电击次数 (错误次数)。

图 5、6 显示了避暗实验测试结果, 每组的实验个数为 8, 数值用均数 $\pm$ 标准误表示, <sup>#</sup>表示与对照组比较有统计学差异( $p<0.05$ ), <sup>\*</sup>表示与模型组比较有统计学差异( $p<0.05$ )。可以看出,  $A\beta_{1-40}$  单侧脑室注射模型组与对照组相比, 小鼠潜伏期明显缩短 ( $P<0.01$ ), 且错误次数明显增加 ( $P<0.05$ ), 表明  $A\beta_{1-40}$  单侧脑室注射致小鼠痴呆模型建立成功。然而 30、60mg/kg 褐藻胶寡糖给药组及阳性药哈伯因组小鼠潜伏期明显延长, 且褐藻胶寡糖三个剂量给药组及阳性药组小鼠错误次数也明显减少, 表明褐藻胶寡糖具有明显改善  $A\beta_{1-40}$  所致

动物学习记忆功能障碍的功能。

#### 褐藻胶寡糖对 A $\beta$ 致痴呆动物生化指标的影响

动物于游泳实验结束后断头处死，立即于冰上分离皮层和海马，经液氮速冻 1 小时后放-80 摄氏度冰箱保存。实验时将皮层和海马分别用生理盐水制成 10%和 5%匀浆，3600 转/分离心，上清液进行 MDA、CuZn-SOD、GSH-PX、Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase、AChE 和 CHAT 活性测定。CHAT 采用同位素标记合成法，其余指标和总蛋白检测均采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定。

##### (1) 胆碱乙酰化转移酶 (ChAT) 活性

A $\beta$ 造模组大脑皮层 ChAT 活性显著低于对照组(P < 0.05)。经褐藻胶寡糖和哈伯因术前及术后给药均可提高 ChAT 活性，其中褐藻胶寡糖 30、60mg/kg 及哈伯因的疗效，在大脑皮层有明显统计学意义。结果见表 8。

表 8. 褐藻胶寡糖对 A $\beta$ 致痴呆模型小鼠皮层 ChAT 活性的影响 (n=10,  $\bar{x} \pm SE$ )

组别	剂量(mg/kg)	ChAT活性 (pmol /mg prot. /min)
对照	—	92.17 $\pm$ 2.95
模型	—	77.26 $\pm$ 4.9 <sup>#</sup>
褐藻胶寡糖	15	90.94 $\pm$ 3.77
	30	99.98 $\pm$ 5.07 <sup>**</sup>
	60	94.69 $\pm$ 5.83 <sup>*</sup>
HBV	0.2	100.70 $\pm$ 5.99 <sup>**</sup>

<sup>#</sup> P < 0.05, 与对照组相比; <sup>\*</sup>P < 0.05, <sup>\*\*</sup> P < 0.01, 与模型组相比

##### (2) 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性

模型组小鼠脑内 SOD 活性低于对照组，提示其抗氧化活性降低，但尚不具统计学意义。经 60mg/kg 的褐藻胶寡糖预防与治疗组可显著升高大脑皮层和海马两部位 SOD 的活性，提示褐藻胶寡糖的抗痴呆机理与提高脑的抗氧化活性有关。结果见表 9。

表 9. 褐藻胶寡糖对 A $\beta$ 致痴呆模型小鼠皮层和海马 SOD 活性的影响 (n=10,  $\bar{x} \pm SE$ )

组别	剂量 (mg/kg)	SOD活性 (NU / mg prot.)	
		皮层	海马
对照	—	53.48 $\pm$ 1.56	66.35 $\pm$ 4.74
模型	—	49.99 $\pm$ 2.41	62.24 $\pm$ 4.16
褐藻胶寡糖	15	49.35 $\pm$ 2.27	69.76 $\pm$ 6.12
	30	51.84 $\pm$ 2.07	61.72 $\pm$ 4.27
	60	57.50 $\pm$ 2.51 <sup>*</sup>	79.97 $\pm$ 7.34 <sup>*</sup>
HBV	0.2	48.95 $\pm$ 2.13	69.91 $\pm$ 6.51

<sup>\*</sup> P < 0.05, 与模型组相比

## (3) 丙二醛 (MDA) 含量

模型组小鼠皮层和海马的 MDA 含量与对照组相比无显著差异。提前给予褐藻胶寡糖并继续治疗的小鼠脑内 MDA 含量下降, 其中 30、60mg/kg 组和哈伯因组均可显著降低 MDA, 提示两种药物均可改善脑内氧化应激和自由基损害, 有利于保护脑组织免受氧化损伤。结果见表 10。

表 10. 褐藻胶寡糖对 A $\beta$ 致痴呆模型小鼠皮层和海马 MDA 的影响 (n=10,  $\bar{x} \pm SE$ )

组别	剂量 (mg/kg)	MDA含量 (nmol / ml)	
		皮层	海马
对照	—	2.61 $\pm$ 0.22	4.75 $\pm$ 0.66
模型	—	2.18 $\pm$ 0.23	5.17 $\pm$ 0.47
褐藻胶寡糖	15	1.79 $\pm$ 0.15	4.28 $\pm$ 0.82
	30	1.87 $\pm$ 0.18	2.48 $\pm$ 0.43**
	60	1.47 $\pm$ 0.11**	2.18 $\pm$ 0.43**
HBV	0.2	1.61 $\pm$ 0.13*	2.26 $\pm$ 0.39**

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, 与模型组比

## (4) 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性

模型组小鼠皮层和海马部位的 GSH-PX 活性低于对照组, 其中海马部位达到显著性差异 (P < 0.05)。经给予褐藻胶寡糖后有所升高, 其中褐藻胶寡糖 60mg/kg 组的皮层、哈伯因组海马的酶活性与模型相比达显著差异 (p < 0.05)。结果见表 11。

表 11. 褐藻胶寡糖对 A $\beta$ 致痴呆小鼠皮层和海马 GSH-PX 活性的影响 (n=10,  $\bar{x} \pm SE$ )

组别	剂量 (mg/kg)	GSH-PX (U / mg prot)	
		皮层	海马
对照	—	7.81 $\pm$ 1.20	5.39 $\pm$ 0.67
模型	—	6.43 $\pm$ 1.56	3.13 $\pm$ 0.58#
褐藻胶寡糖	15	8.53 $\pm$ 0.86	4.13 $\pm$ 0.58
	30	7.12 $\pm$ 1.10	4.25 $\pm$ 0.54
	60	10.75 $\pm$ 1.80*	4.81 $\pm$ 0.95
HBV	0.2	8.85 $\pm$ 1.33	5.29 $\pm$ 0.99*

#P < 0.05, 与对照组比; \* P < 0.05, 与模型组比

(5) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase 活性

模型组小鼠皮层和海马的 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性显著低于对照组, 提示 A $\beta$ 对脑内神经细胞的能量代谢有明显影响。提前给予褐藻胶寡糖并继续治疗的小鼠脑内该酶活性有显著升高, 三个剂量组均可显著提高大脑皮层 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性, 高剂量组可明显提高海马部位 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性, 该治疗效果强于哈伯因, 提示提高脑内能量代谢水平可能是褐藻胶寡糖保护脑功能并抗痴呆的作用机理之一。结果见表 12。

表 12. 褐藻胶寡糖对 A $\beta$ 致痴呆小鼠皮层和海马 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP 酶活性的影响 (n=10,  $\bar{x} \pm SE$ )

组别	剂量 (mg/kg)	ATP酶活性 ( $\mu\text{mol Pi/mg prot. /hour}$ )	
		皮层	海马
对照	—	1.06 $\pm$ 0.05	2.65 $\pm$ 0.38
模型	—	0.89 $\pm$ 0.06 <sup>#</sup>	1.62 $\pm$ 0.17 <sup>#</sup>
褐藻胶寡糖	15	1.08 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	2.10 $\pm$ 0.29
	30	1.09 $\pm$ 0.08 <sup>*</sup>	2.07 $\pm$ 0.23
	60	1.08 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	2.52 $\pm$ 0.25 <sup>*</sup>
HBV	0.2	0.91 $\pm$ 0.05	2.35 $\pm$ 0.43

<sup>#</sup> P < 0.05, 与对照组相比; <sup>\*</sup> P < 0.05, 与模型组相比

## 2. 褐藻胶寡糖体外对 A $\beta$ 引起神经细胞损伤的保护作用

5 参照 Banker GA 等, Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res*, 1977, 126:397-425 中记载的方法培养原代大鼠皮层神经细胞, 在开始培养后一周开始进行实验。即在第 8 天将细胞换液, 并向细胞中加入终浓度为 0、10、50、100  $\mu\text{g/ml}$  的褐藻胶寡糖, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 小时后, 加入老化的 A $\beta_{25-35}$  (A $\beta_{25-35}$  溶解于灭菌的双蒸水中, 使其终浓度为 1 mg/ml, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  放置 7 天进行老化, 老化的 A $\beta$ 分装后于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存), 终浓度为 30  $\mu\text{M}$ , 继续培养 24 小时, 加 10  $\mu\text{l}$  5 mg/ml 的 MTT, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 小时后, 去除上清, 加入 150  $\mu\text{l}$  DMSO 于酶联免疫测定仪上以测定波长 570 nm, 参比波长 630 nm 测定吸光值。

15 结果发现, 30  $\mu\text{M}$  老化的 A $\beta_{25-35}$  与原代神经细胞孵育 24 小时后, 细胞 MTT 还原明显降低, 细胞存活率降低到 54.5  $\pm$  8.9% ( $p < 0.001$ ), 而用 10、50、100  $\mu\text{g/ml}$  的褐藻胶寡糖预处理 24 小时可以明显改善 A $\beta_{25-35}$  对细胞的毒性损伤, 并且随着药物剂量的增加, 这种改善作用越明显, 其中 100  $\mu\text{g/ml}$  的褐藻胶寡糖作用最显著 (细胞存活率分别为 72.0  $\pm$  11.2%、77.1  $\pm$  8.1% 和 82.3  $\pm$  11.6%)。

20 褐藻胶寡糖对神经母细胞瘤 SH-SY5Y 也得到与原代神经细胞相似的结果。30  $\mu\text{M}$  老化的 A $\beta_{25-35}$  (如图 7 所示) 及 2  $\mu\text{M}$  老化的 A $\beta_{1-40}$  (如图 8 所示) 与 SH-SY5Y 细胞作用 48 小时均可明显引起细胞的损伤, 细胞数目减少, 部分细胞变圆, 可以看见部分悬浮细胞, 细胞存活率分别降到 73.3 $\pm$ 9.4%、64.1 $\pm$ 2.5%, 然而 50、100  $\mu\text{g/ml}$  的褐藻胶寡糖对其具有明显抑制作用, 细胞悬浮减少, 存活率增加。

25 由以上实验结果可以看出, 褐藻胶寡糖体内可明显缩短 A $\beta_{1-40}$  侧脑室注射所致 AD 小鼠的逃避潜伏期, 增加 A $\beta_{1-40}$  侧脑室注射所致 AD 小鼠穿越原平台的次数, 缩短第一次达到原平台所在位置的时间, 对 A $\beta_{1-40}$  侧脑室注射所致 AD 动物的学习记忆功能有明显改善作用; 同时, 褐藻胶寡糖体外可明显抑制 A $\beta$  对原代培养及神经细胞株的损伤。提示褐藻胶寡糖对 AD 具有一定的防治作用。

## (四) 褐藻胶寡糖抗 AD 作用机制的研究

### 1. 褐藻胶寡糖对 A $\beta_{25-35}$ 引起 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

SH-SY5Y 细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板, 细胞融合后加入 0、50、100  $\mu\text{g/ml}$  的褐藻胶寡糖作用 24 小时, 再加入终浓度为 30  $\mu\text{M}$  老化的  $\text{A}\beta_{25-35}$  (Sigma 公司产品), 继续培养 48 小时, 消化、收集细胞, 1200 转离心 5 min, 去上清, 用 pH7.2 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗细胞 2 次, 加入 100 u/ml RNase (Hyclone 公司产品) 和 5  $\mu\text{g/ml}$  PI (Hyclone 公司产品) 混合液 200  $\mu\text{l}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 分钟, 用流式细胞仪 (美国 BD 公司产品) 进行测定, 每个样品计数 8000 个细胞。

结果发现, 30  $\mu\text{M}$  老化的  $\text{A}\beta_{25-35}$  刺激 SH-SY5Y 细胞 48 小时后, 明显引起细胞凋亡, 凋亡率为  $24.8 \pm 1.9\%$ , 然而用 50、100  $\mu\text{g/ml}$  的褐藻胶寡糖预处理 24 小时可明显抑制  $\text{A}\beta_{25-35}$  诱导的细胞凋亡, 凋亡率分别为  $10.2 \pm 1.3\%$  和  $5.1 \pm 0.7\%$ 。

深入探讨褐藻胶寡糖抗  $\text{A}\beta$  所致神经细胞凋亡的作用机制发现, 褐藻胶寡糖可明显抑制  $\text{A}\beta$  诱导的神经细胞内游离钙离子浓度的升高、自由基的产生、细胞脂质过氧化产物含量的增加, 线粒体膜电位的降低以及凋亡促进蛋白 P53 和 Caspase-3 蛋白表达的升高, 并促进凋亡抑制蛋白 Bcl-2 表达的上调, 提示褐藻胶寡糖拮抗  $\text{A}\beta$  细胞毒性损伤是通过其抗氧化、抑制胞内游离钙浓度的升高而增加凋亡抑制蛋白的表达、阻断下游凋亡促进蛋白的表达, 从而最终抑制细胞的凋亡。

## 2. 在分子水平上探讨褐藻胶寡糖抗 $\text{A}\beta$ 神经毒性的作用机制

### (1) 褐藻胶寡糖对 $\text{A}\beta_{1-40}$ 纤丝形成的影响

将新配制的  $\text{A}\beta_{1-40}$  与 0、10、50、100  $\mu\text{g/ml}$  的褐藻胶寡糖混合于 TBS 缓冲液中 (100 mM Tris, 50 mM NaCl, pH 7.4), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 24 小时, 然后加入 Th-T, 用荧光分光光度计在激发波长  $\lambda_{\text{ex}}$  为 450 nm, 发射波长  $\lambda_{\text{em}}$  为 480 nm 下测定 Th-T 荧光强度。

结果发现 10、50、100  $\mu\text{g/ml}$  的褐藻胶寡糖均可抑制  $\text{A}\beta_{1-40}$  聚集, 且 100  $\mu\text{g/ml}$  的褐藻胶寡糖抑制作用最强, 其荧光强度分别为  $10.46 \pm 0.94$ 、 $9.18 \pm 1.32$  和  $7.81 \pm 1.38$  ( $p$  值分别  $< 0.05$ 、 $0.05$  和  $0.001$ )。同时采用电镜技术观察了褐藻胶寡糖对  $\text{A}\beta_{1-40}$  纤丝形成的影响, 结果见图 9, 同样表明褐藻胶寡糖可明显抑制  $\text{A}\beta_{1-40}$  纤丝的形成。采用相同的技术研究发现, 褐藻胶寡糖对肝素促  $\text{A}\beta_{1-40}$  纤丝形成具有明显的抑制作用。结果见图 9, A 为  $\text{A}\beta_{1-40}$  孵育 24 小时结果, B 为  $\text{A}\beta_{1-40}$  和肝素混合孵育 24 小时结果, C 表示  $\text{A}\beta_{1-40}$  和褐藻胶寡糖共同孵育 24 小时结果, D 为  $\text{A}\beta_{1-40}$  和肝素及褐藻胶寡糖共同孵育 24 小时结果, E 为  $\text{A}\beta_{1-40}$  孵育 48 小时结果, F 为  $\text{A}\beta_{1-40}$  和肝素混合孵育 48 小时结果, G 为  $\text{A}\beta_{1-40}$  和褐藻胶寡糖共同孵育 48 小时结果, H 为  $\text{A}\beta_{1-40}$  和肝素及褐藻胶寡糖混合孵育 48 小时结果。

### (2) 褐藻胶寡糖对纤丝化 $\text{A}\beta_{1-40}$ 解聚的影响

$\text{A}\beta_{1-40}$  用无菌去离子双蒸水溶解, 配成 1 mg/ml, 然后用 Eppendorf 管分装, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  老化 7 天。取 1 mg/ml 老化  $\text{A}\beta_{1-40}$  与褐藻胶寡糖混合, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 3 天, 样品用 2% 醋酸铀负染,  $\text{A}\beta_{1-40}$  纤丝形态采用 JEM-1200EX 透射电镜观察。结果表明,  $\text{A}\beta_{1-40}$  老化 7 天后形成相互交错、相互聚集的纤丝, 然而在纤丝化  $\text{A}\beta_{1-40}$  中加入褐藻胶寡糖孵育 3 天后,  $\text{A}\beta$  纤丝量明显减少, 纤丝断裂、变短。结果如图 10, A 为  $\text{A}\beta$ , B 为肝素和  $\text{A}\beta$ , C 为褐藻胶寡糖和

A $\beta$ 共同孵育的结果。

### (3) 褐藻胶寡糖对 A $\beta$ 构象改变的影响

用无菌 TBS (pH 7.4, 100mM Tris, 50mM NaCl) 将 A $\beta_{1-40}$  配制成 250  $\mu$ g/ml 浓度, 将其以 350  $\mu$ l/管分装到 Eppendorf 管中, 分别向其中加入终浓度为 100  $\mu$ g/ml 的无菌褐藻胶寡糖, 混匀后于 37  $^{\circ}$ C 放置 12 小时, 用 J-500A 型 CD 仪 (日本 JASCO 公司生产) 检测构象变化。

结果如图 11 所示, A 为 A $\beta_{1-40}$ , B 为老化的 A $\beta_{1-40}$  和肝素混合物, C 为 A $\beta_{1-40}$  和褐藻胶寡糖混合物的测定图。结果发现, A $\beta_{1-40}$  在 37  $^{\circ}$ C 放置 12 小时基本完全呈 $\beta$ -折叠构象, 而 HSH-971 明显抑制 A $\beta_{1-40}$  由 $\alpha$ -螺旋转变为 $\beta$ -折叠。

### (4) 褐藻胶寡糖与 A $\beta$ 相互作用的研究

以 SPR 技术 (BIAcore X, 瑞典 Uppsala) 在 25 $^{\circ}$ C 下, 以 5  $\mu$ l/min 的流速流经缓冲液 HBS-EP 缓冲液 (0.01 M HEPES, 150 mmol/L NaCl, 3.4 mmol/L EDTA- $\text{Na}_2$ , 0.005% (V/V) 吐温-20, pH 7.4)。将 A $\beta_{1-40}$  用 HBS-EP 缓冲液配制成 1 mg/ml 的储备液, 分装后置于 37  $^{\circ}$ C。分别于 0、0.5、1、2、4、6 天这几个时间点取出 A $\beta_{1-40}$ , 将其倍比稀释成 5 个浓度梯度, 在 25  $^{\circ}$ C 下, 以 5  $\mu$ l/min 的流速流经褐藻胶寡糖芯片 (注射体积为 10  $\mu$ l), 记录 A $\beta$ 与褐藻胶寡糖的结合曲线, 用 2 M NaCl 再生芯片。

结果表明, 褐藻胶寡糖与不同聚集程度 A $\beta_{1-40}$  均有结合, 褐藻胶寡糖与新鲜的 A $\beta_{1-40}$  结合能力最弱, 其结合  $K_D$  值为 6.85E-07 M, 但随着 A $\beta$ 老化时间的延长, 褐藻胶寡糖与之结合能力逐渐增加 ( $K_D$  值分别为 1.07E-07、9.06E-08、5.43E-08、2.15E-08、1.45E-08 M), 2 天以后增加幅度减小, 基本达到稳定。

进一步研究发现, 褐藻胶寡糖是通过 His13~Lys16 与 A $\beta$ 全长分子相互作用的; 通过 Ser26~Lys28 与 A $\beta_{25-35}$  结合。褐藻胶寡糖与新鲜 A $\beta$ 相互结合是其抑制 A $\beta$ 构象转变、进而抑制纤丝形成的重要原因; 褐藻胶寡糖与老化 A $\beta$ 相互结合是其促进纤丝态 A $\beta$ 解聚的重要原因。

以上作用机制研究发现褐藻胶寡糖通过与 A $\beta$  分子结合而抑制 A $\beta$  纤丝形成, 促进 A $\beta$  纤丝解聚, 进而抑制 A $\beta$  引起的神经细胞钙离子超载, 清除其自由基形成, 而抑制神经细胞凋亡, 保护神经细胞免受损伤, 从而发挥抗老年性痴呆的作用。

### (五) 褐藻胶寡糖抗糖尿病作用研究

#### 1. 褐藻胶寡糖体外对胰淀素损伤胰岛 $\beta$ 细胞的保护作用

人胰岛 $\beta$ 细胞 NIT 株用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养, 以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板, 细胞融合后, 加入 0、10、50、100  $\mu$ g/ml 褐藻胶寡糖作用 24 小时, 加入终浓度为 30  $\mu$ M 老化的胰淀素 (amylin, 又称胰岛淀粉样蛋白多肽, 简称 IAPP), 继续培养 48 小时后, 以 MTT 法测定细胞的存活。结果发现, 褐藻胶寡糖预处理 24 小时可以明显改善 IAPP 对细胞的毒性作用, 增强细胞的存活, 并且随着药物剂量的增加, 这种改善作用越明显。结果见图 12, 每组的实验个数为 6, 数值用均数 $\pm$ 标准差表示, ##表示与对照组比较有统计学差异 ( $p < 0.01$ ), \*及\*\*表示与 IAPP 组比较有统计学差异 ( $p < 0.05$  及  $p < 0.01$ )。表明褐藻胶寡糖

具有拮抗 IAPP 对胰岛 $\beta$ 细胞损伤的作用。

## 2. 褐藻胶寡糖体内对链脲霉素致糖尿病小鼠模型的影响

体重 18-22g 雄性 NIH 小鼠 60 只, 随机分为正常组、模型组、褐藻胶寡糖 50、150、450 mg/kg 组及优降糖 5mg/kg 组。试验当天, 除正常组外, 其余动物均腹腔注射链脲霉素 150mg/kg。连续给予相应药物 10 天, 第 11 天摘眼球取血, 测血糖浓度。结果发现, 各给药组小鼠血糖浓度明显低于模型组, 说明褐藻胶寡糖对链脲霉素所致糖尿病模型小鼠具有一定的治疗作用 (表 13)。

表 13. 褐藻胶寡糖对链脲霉素致糖尿病小鼠血糖的影响 ( $\bar{x} \pm SD$ )

组别	剂量 (mg/kg)	动物数 (只)	血糖浓度 (mg/dL)
对照	—	10	150.6 $\pm$ 36.8
模型	—	10	312.4 $\pm$ 89.2 <sup>###</sup>
褐藻胶寡糖	50	10	219.4 $\pm$ 67.8*
	150	10	179.6 $\pm$ 69.8**
	450	10	162.5 $\pm$ 3**
优降糖	5	10	201.6 $\pm$ 58.9**

<sup>###</sup> P < 0.05, 与对照组比; \* P < 0.05, \*\*p<0.01 与模型组比;

以聚合度为 2-22 的褐藻胶寡糖及其氧解产物或混和物进行体内外抗老年痴呆和抗糖尿病的实验, 也得到了类似的实验结果。附图 13-16 是褐藻胶寡糖氧解产物混合物对 A $\beta$ 1-40 脑内注射所致痴呆小鼠行为学测定的结果, 每组的实验个数为 8, 数值用均数 $\pm$ 标准误表示, #及##表示与对照组比较有统计学差异 (p<0.05, p<0.01), \*及\*\*表示与模型组比较有统计学差异 (p<0.05, p<0.01)。可以看出, 褐藻胶寡糖氧解产物混合物可明显增强痴呆动物的学习记忆能力。附图 17 是褐藻胶寡糖氧解产物混合物对 IAPP(amylin)损伤胰岛 $\beta$ 细胞株 NIT 保护作用的测定结果, 每组的实验个数为 6, 数值用均数 $\pm$ 标准差表示, ##表示与对照组比较有统计学差异 (p<0.01), \*及\*\*表示与 IAPP 组比较有统计学差异 (p<0.05, p<0.01)。可以看出, 褐藻胶寡糖氧解产物混合物对糖尿病具有明显防治作用。

## (六) 统计学处理

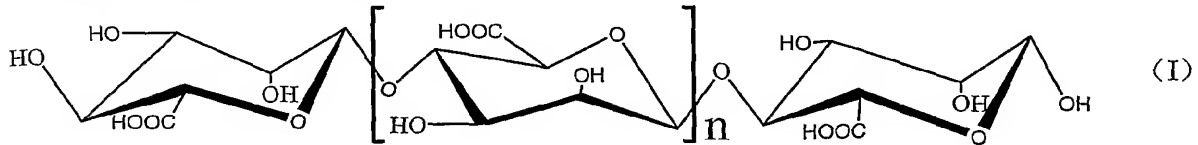
以上数据应用 Statview 统计处理软件进行统计分析, 结果以“均值 $\pm$ 标准误”(Mean values $\pm$ SE)表示, 采用方差分析 (ANOVA) 进行比较。

根据上述药理结果, 用常规的制剂手段将有效量的本发明的褐藻胶寡糖与药用载体混合, 可以制备药学组合物。所述药学组合物包括 $\beta$ -淀粉样蛋白纤丝形成抑制剂、胰岛淀粉样蛋白纤丝形成抑制剂。本发明的褐藻胶寡糖在制备老年性痴呆症和糖尿病防治药物中的应用具有特别重要的意义。



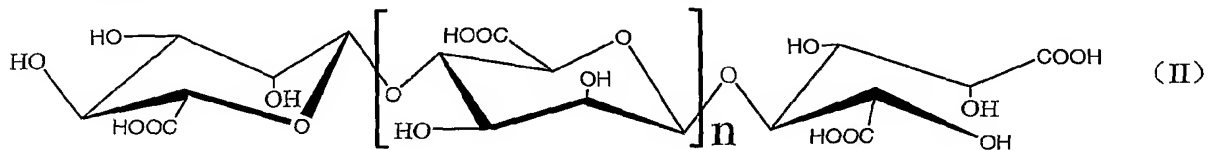
# 权 利 要 求

1. 下式 (I) 表示的褐藻胶寡糖或其衍生物或它们的药用盐, 所述褐藻胶寡糖由 $\beta$ -D-甘露糖醛酸经 $\alpha$ -1,4 糖苷键连接而成, 由下列结构式 (I) 表示:



式中,  $n$  表示 0 或 1—19 的整数。

2. 根据权利要求 1 所述的褐藻胶寡糖或其衍生物或它们的药用盐, 其特征在于, 所述褐藻胶寡糖衍生物的还原端 1 位为羧基, 由下列结构式 (II) 表示:



式中,  $n$  表示 0 或 1—19 的整数。

3. 根据权利要求 1 所述的褐藻胶寡糖或其衍生物或它们的药用盐, 其特征在于,  $n=2$ —12, 更好的是,  $n=4-8$ 。

4. 权利要求 1 所述的褐藻胶寡糖或其衍生物或它们的药用盐的制造方法, 它包括以下步骤: 将褐藻酸盐水溶液在高压釜中于 pH2-6、反应温度约 100-120°C 的条件下反应时间约 2-6 小时;

反应中止后, 调节 pH 值至约 7。

5. 根据权利要求 4 所述的制造方法, 其特征在于, 所述褐藻酸盐是褐藻酸钠; 在 pH4、110°C 的条件下反应 4 小时。

6. 根据权利要求 4 所述的制造方法, 其特征在于, 调节 pH 值至约 7 后, 醇沉, 将醇沉物质抽滤, 脱水, 干燥, 脱盐。

7. 根据权利要求 4 所述的制造方法, 其特征在于, 将褐藻酸盐水溶液在高压釜中于 pH2-6、反应温度约 100-120°C 的条件下反应时间约 2-6 小时后, 再加入氧化剂, 在反应温度 100-120°C 的条件下反应 15 分钟至 2 小时。

8. 根据权利要求 7 所述的制造方法, 其特征在于, 所述氧化剂是氢氧化铜; 在 100°C 的条件下反应 30 分钟。

9. 药学组合物, 它包含有效量的权利要求 1—3 中任一项所述的褐藻胶寡糖或其衍生物和药用载体。

10. 根据权利要求 9 所述的药学组合物, 其特征在于, 它是老年性痴呆症防治药物、 $\beta$ -淀粉样蛋白纤维形成抑制剂、糖尿病防治药物、胰岛淀粉样蛋白纤维形成抑制剂、纤维解聚促进剂中的任一种。

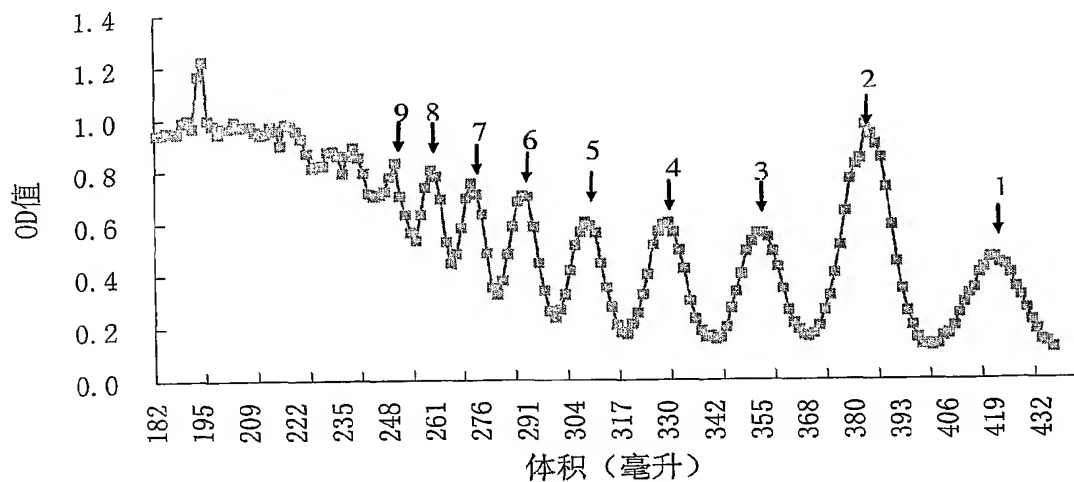


图 1

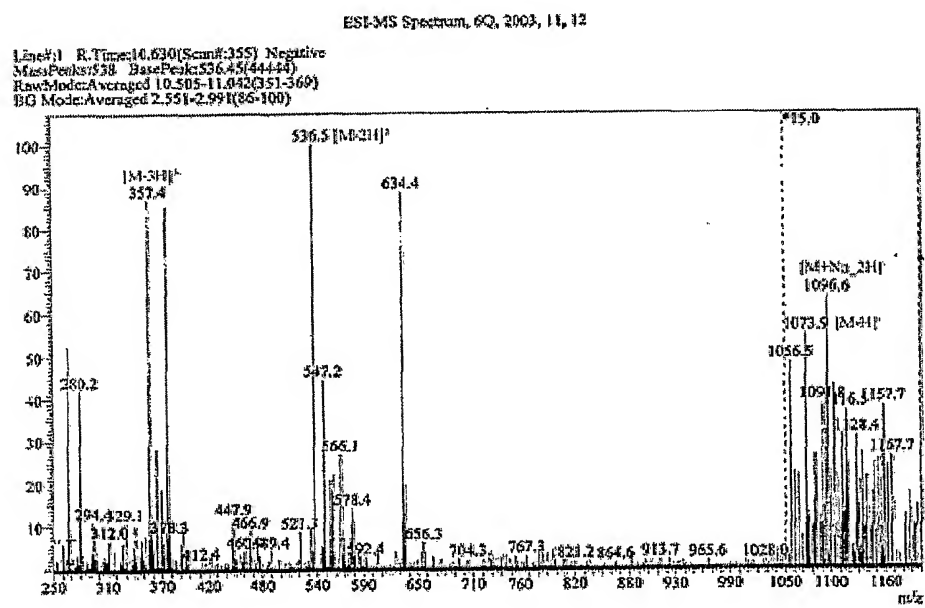


图 2

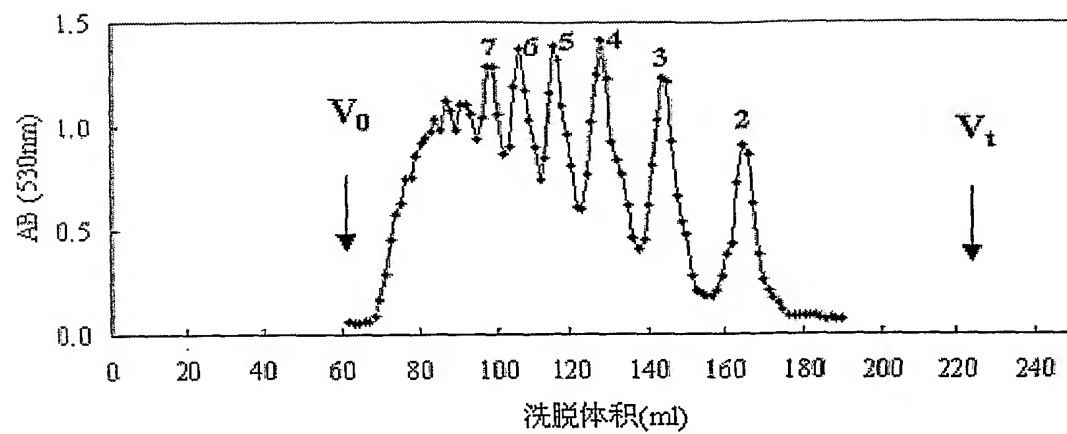


图 3

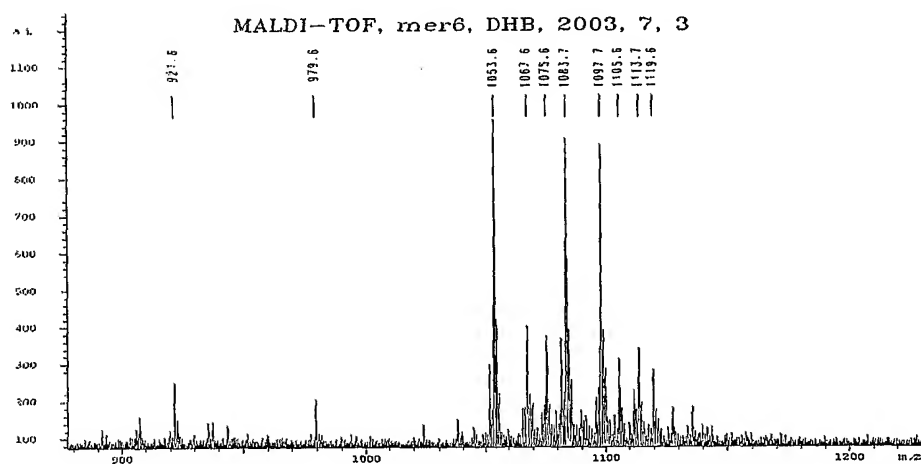


图 4

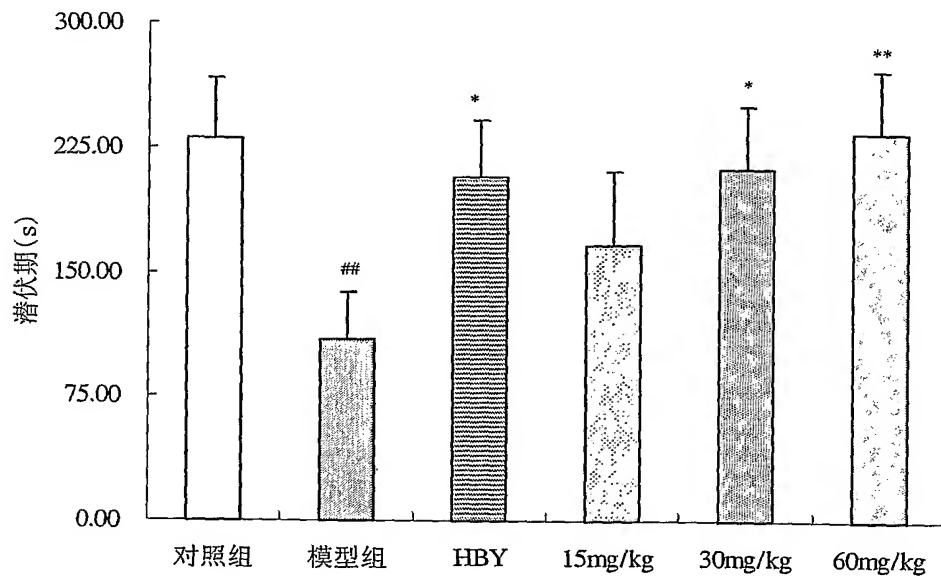


图 5

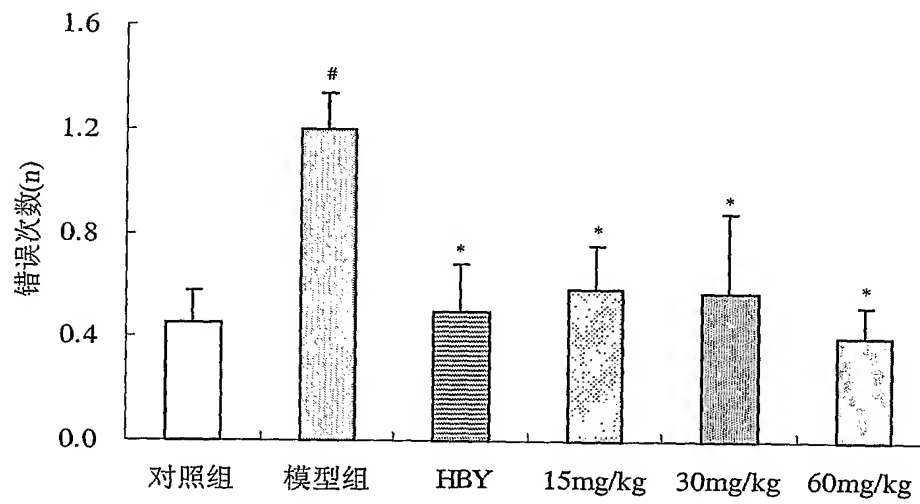


图 6

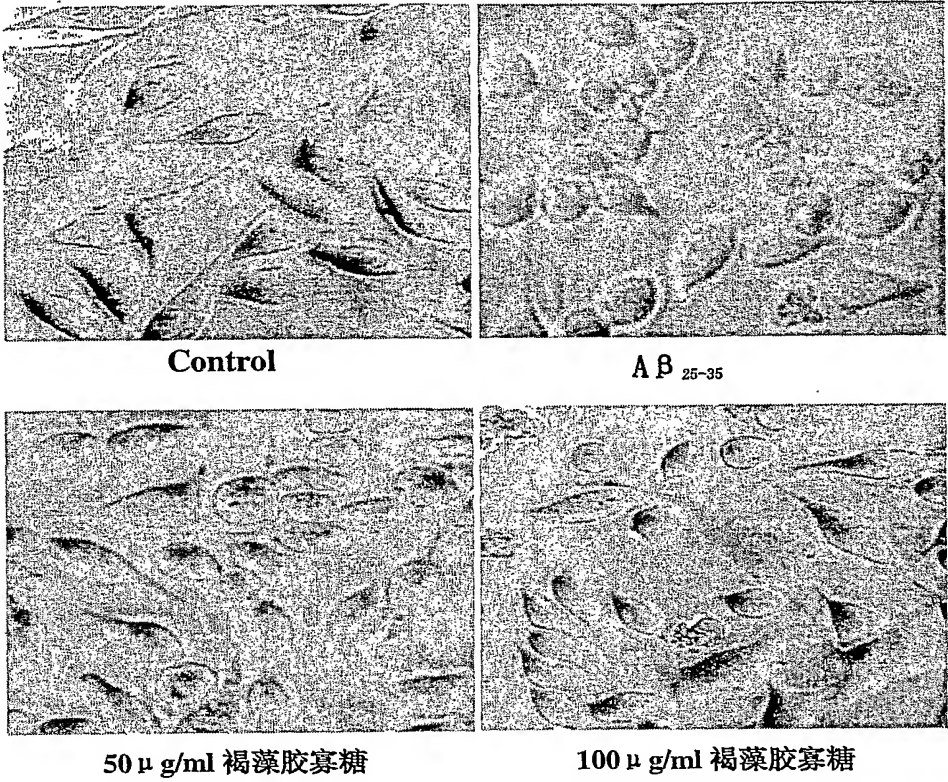


图 7

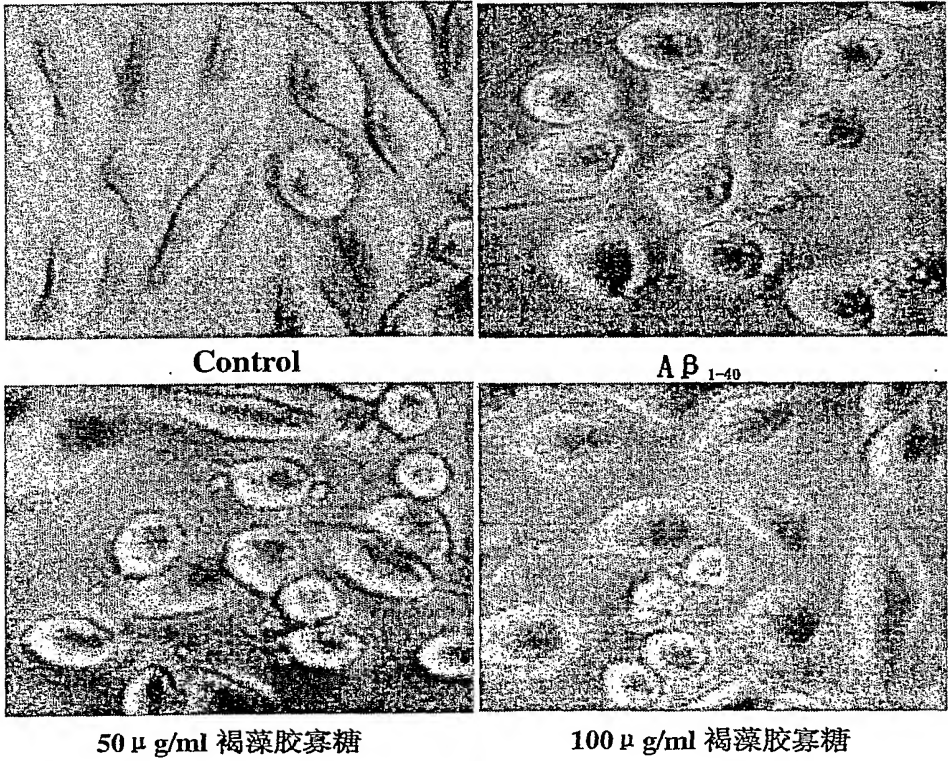


图 8

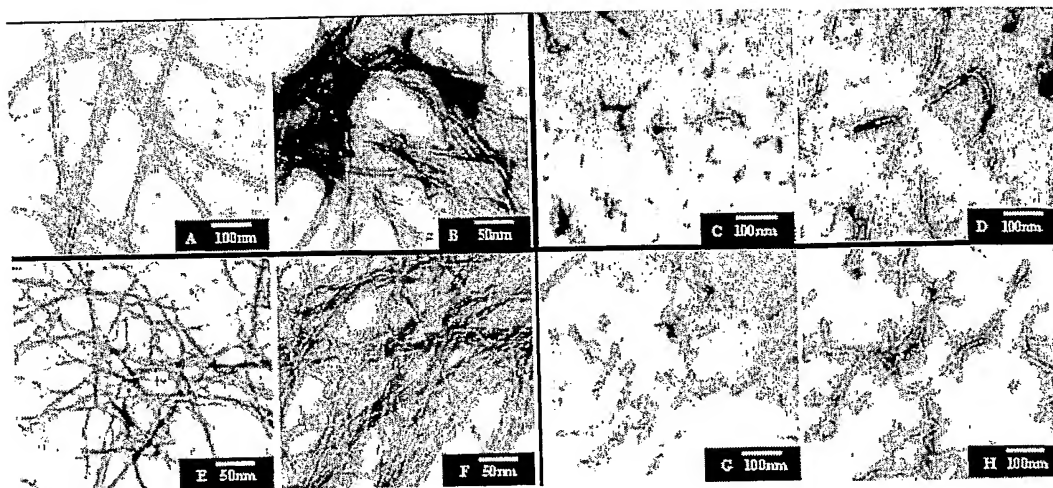


图 9

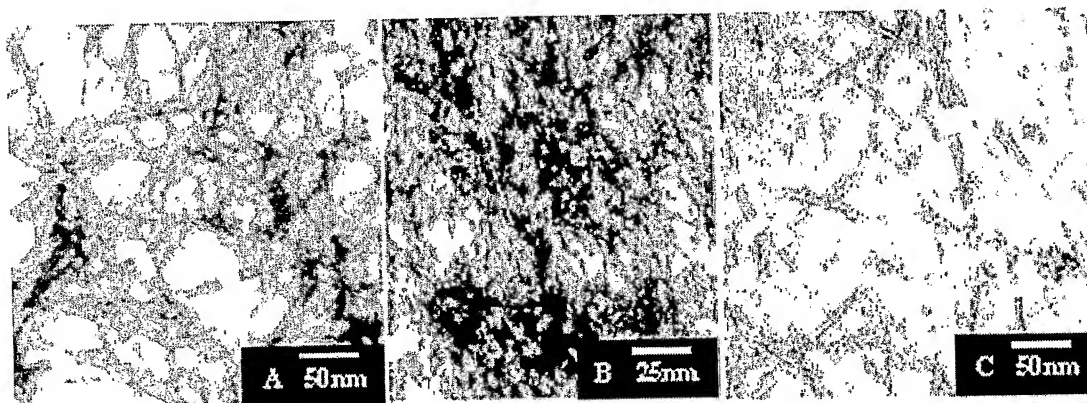


图 10

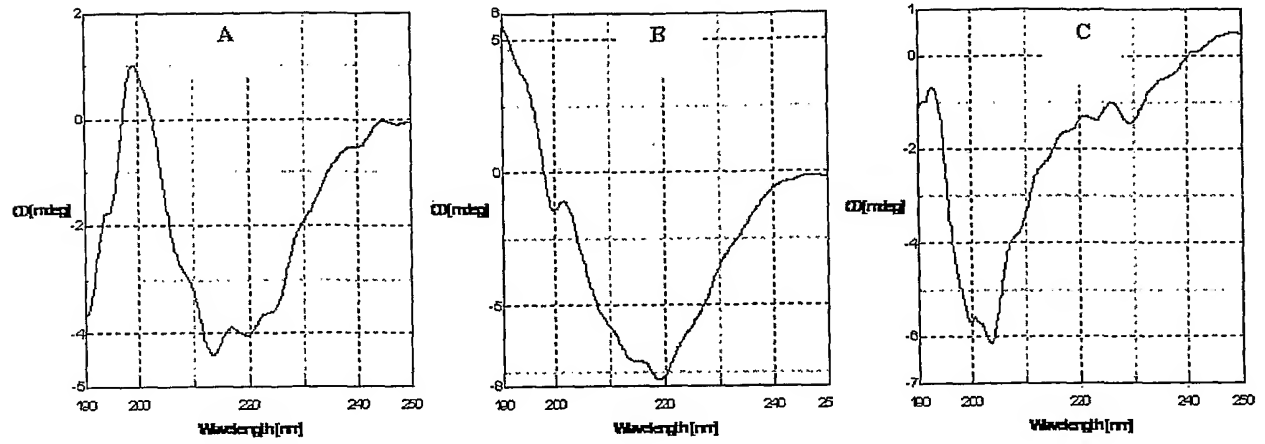


图 11

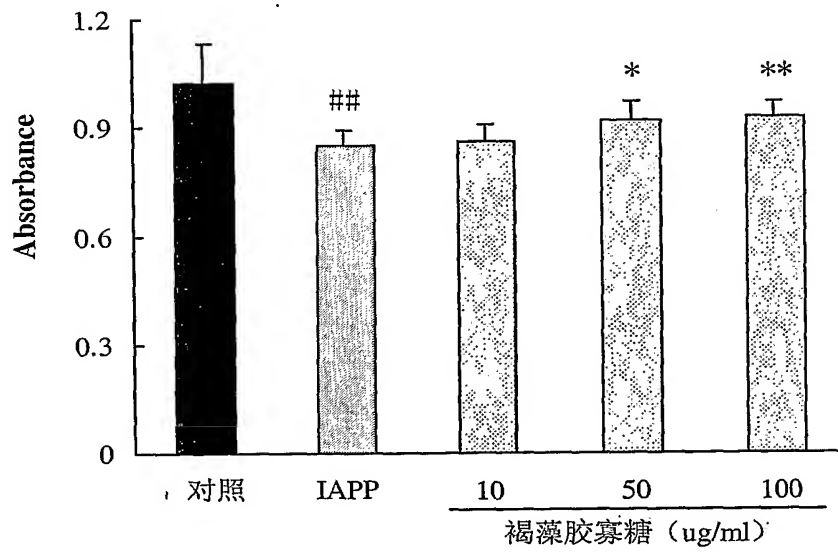


图 12

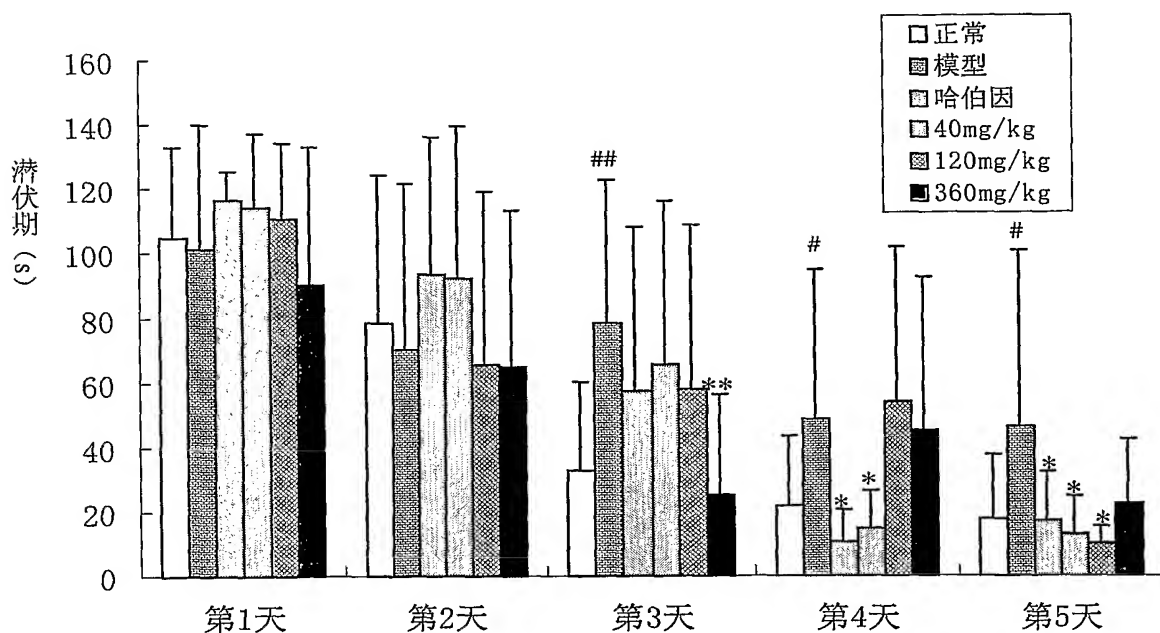


图 13

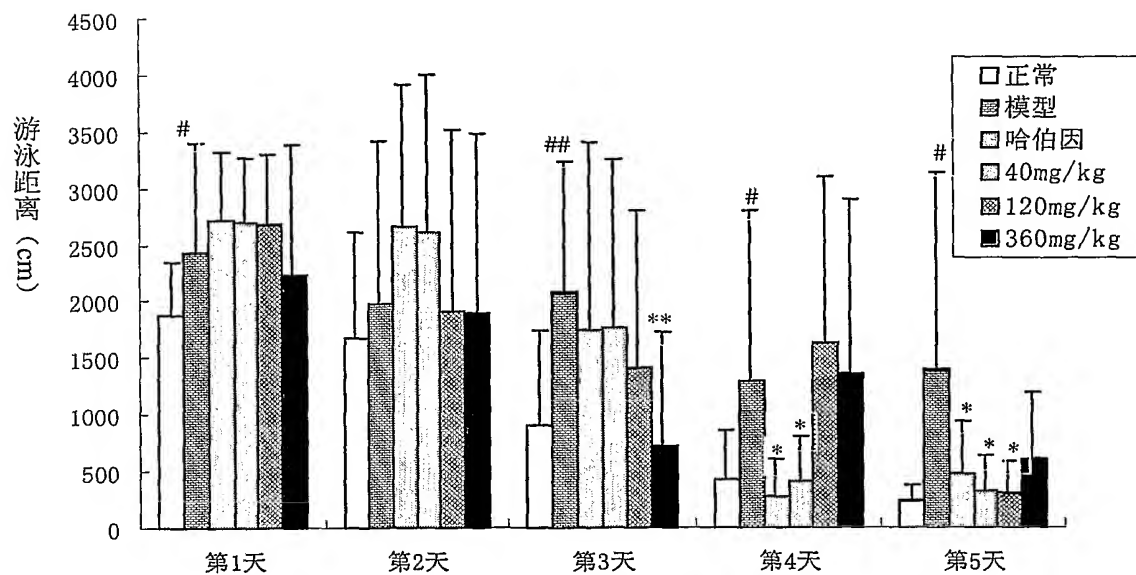


图 14



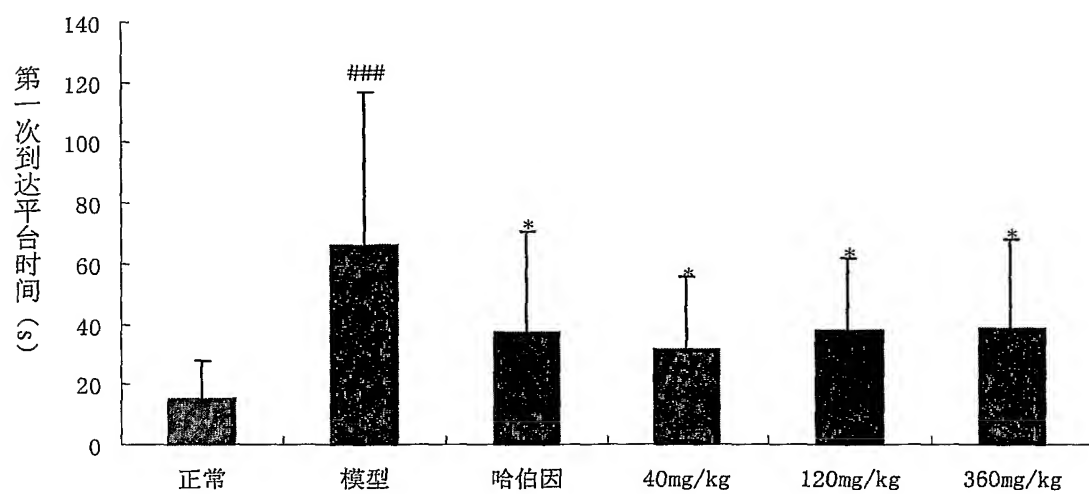


图 15

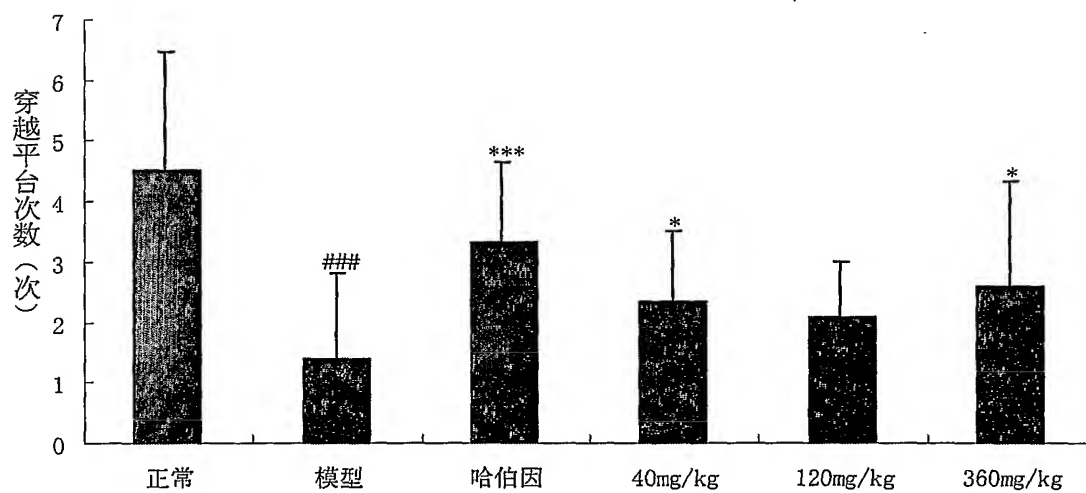


图 16

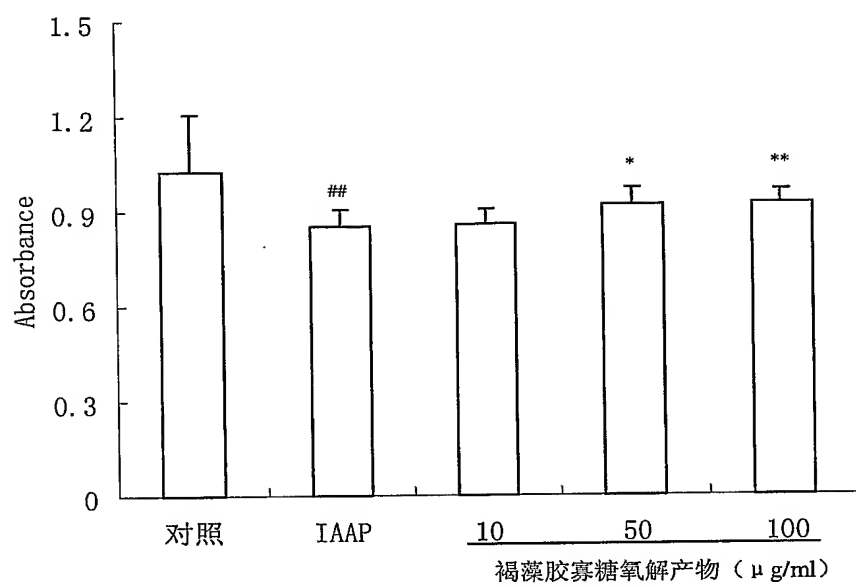


图 17

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2005/000226

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>7</sup>: A61K31/702, C08B37/00, C07H3/06, A61P25/28, A61P3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: A61K, C08B, C07H, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CPRS, Chinese Pharmaceutical Abstract, CNKI

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPDOC, PAJ, Chinese Pharmaceutical Abstract, CNKI(CN), CA, MEDLINE

algin, mannuronic acid, guluronic acid, mannuronate,  $\beta$ , D,  $\alpha$ , 1,4, oligosaccharide, hydrolyze, acid, temperature, press, Alzheimer's dementia, senile dementia, diabetes, mellitus

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1401786 A, 12.Mar.2003 (12.03.2003) description page 1	1, 3, 9, 10
X	CN 1341665 A, 27.Mar.2002 (27.03.2002) description page 2	1, 3, 9, 10
X	CN1414002 A, 30.Apr.2003 (30.04.2003) description	1, 3, 9, 10
X	CN 1473836 A, 11.Feb.2004 (11.02.2004) see the whole document	2, 9, 10
P, X	CN 1562050 A, 12.Jan.2005 (12.01.2005) see the whole document	2, 9, 10
P, X	CN 1486988 A, 7.Apr. 2004 (07.04.2004) see the whole document	2, 9, 10
A	CN 1380342 A, 20.Nov.2002 (20.11.2002) see the whole document	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25.Apr.2005 (25.04.2005)

Date of mailing of the international search report

19 · MAY 2005 (19 · 05 · 2005)

Name and mailing address of the ISA/CN  
The State Intellectual Property Office, the P.R.China  
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China  
100088  
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

HUANG Yijie

Telephone No. 86-10-62085252



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2005/000226

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

[illegible]

International application No.  
PCT/CN2005/000226

Form PCT/ISA /210 (patent family annex) (April 2005)

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2005/000226

## A. 主题的分类

IPC<sup>7</sup>: A61K31/702, C08B37/00, C07H3/06, A61P25/28, A61P3/10

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: A61K, C08B, C07H, A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利文献, 中国药学文摘库, CNKI

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, PAJ, 中国药学文摘库(CN), CNKI, CA, MEDLINE

褐藻胶, 褐藻, 寡糖, 甘露糖醛酸, 古罗糖醛酸,  $\beta$ , D,  $\alpha$ , 1, 4, 酸水解, 高压, 高温, 老年, 痴呆, 糖尿病, algin, mannuronic acid, guluronic acid, mannuronate, oligosaccharide, hydrolyze, acid, temperature, press, Alzheimer's dementia, senile dementia, diabetes, mellitus

## C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 1401786 A(青岛海洋大学) 12.3 月 2003 (12.03.2003) 说明书第 1 页	1, 3, 9, 10
X	CN 1341665 A(青岛海洋大学) 27.3 月 2002 (27.03.2002) 说明书第 2 页	1, 3, 9, 10
X	CN1414002 A(青岛海洋大学) 30.4 月 2003 (30.04.2003) 说明书	1, 3, 9, 10
X	CN 1473836 A(中国海洋大学) 11.2 月 2004 (11.02.2004) 全文	2, 9, 10
P,X	CN 1562050 A(中国海洋大学) 12.1 月 2005 (12.01.2005) 全文	2, 9, 10
P,X	CN 1486988 A(中国海洋大学) 7.4 月 2004 (07.04.2004) 全文	2, 9, 10
A	CN 1380342 A(青岛海洋大学) 20.11 月 2002 (20.11.2002) 全文	1—10
A	CN 1341664 A(青岛海洋大学) 27.3 月 2002 (27.03.2002) 全文	1—10

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

25.4 月 2005 (25.04.2005)

国际检索报告邮寄日期

19.5 月 2005 (19.05.2005)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员



电话号码: (86-10) 62085252

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 1408360 A(青岛海洋大学)9.4 月 2003 (09.04.2003) 全文	1—10
A	CN 1454992 A(中国海洋大学)12.11 月 2003 (12.11.2003) 全文	1—10

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号  
PCT/CN2005/000226

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1401786 A	12.03.2003	无	
CN 1341665 A	27.03.2002	无	
CN1414002 A	30.04.2003	无	
CN 1473836 A	11.02.2004	无	
CN 1562050 A	12.01.2005	无	
CN 1486988 A	07.04.2004	无	
CN 1380342 A	20.11.2002	无	
CN 1341664 A	27.03.2002	无	
CN 1408360 A	09.04.2003	无	
CN 1454992 A	12.11.2003	无	